

令和元年6月20日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08049

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いたイヌ変性性脊髄症の病態解明と治療研究

研究課題名(英文) Investigation on pathomechanism and treatment of canine degenerative myelopathy using disease-specific iPS cell

研究代表者

神志那 弘明 (Kamishina, Hiroaki)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50506847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：変性性脊髄症(DM)の疾患特異的iPS細胞を樹立し、症例の遺伝的背景を持ち合わせたDMの*in vitro*モデルの構築を行なった。初期化因子の導入法について、複数の導入方法および異なるベクターの比較検討を行ったが、安定したiPS細胞の樹立には至らなかった。代わりにDMの*in vitro*モデルとして犬変異型SOD1遺伝子導入細胞を用いたモデル構築に成功し、E40Kによって小胞体ストレスが誘導され、それに対する応答としてBiP陽性ミクログリアの増加およびアストロサイトのBiP発現が引き起こされていることを明らかにした。脊髄における小胞体ストレス誘導性炎症がDMの病態に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変性性脊髄症(DM)は犬に発生する神経疾患であり、人のALS同様に筋肉が徐々に弱って行く疾患である。現時点で治療法はなく、また正確な病態も解明されていない。本研究では、症例の遺伝的背景を持ち合わせたDMの疾患特異的iPS細胞を樹立し、DMの病態解明を進展させることを目的とした。初期化因子の導入方法および異なるベクターの比較検討を行ったが、安定したiPS細胞の樹立には至らなかった。代わりにDMの*in vitro*モデルとして犬変異型SOD1遺伝子導入細胞を用いたモデル構築に成功した。このモデルを用いて実験を行ったところ、脊髄における小胞体ストレス誘導性炎症がDMの病態に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to establish disease-specific iPS cells of canine degenerative myelopathy (DM). Although different transfection methods and vectors were used, stable iPS cells were not obtained. Alternatively, we transduced canine mutant SOD1 gene (E40K) into cultured neurons and successfully established *in vitro* model of DM, which recapitulated endoplasmic reticulum (ER) stress. It was thought that E40K induces ER stress in the spinal cord of DM cases and, resulting in activation and expression BiP in recruited microglia and astrocytes. The ER stress-induced neuroinflammation seems to be the important events underlying degenerative changes of DM.

研究分野：獣医臨床神経病学

キーワード：変性性脊髄症 神経変性 小胞体ストレス SOD1 ミスフォールド ALS

1. 研究開始当初の背景

変性性脊髄症 (DM) はウェルシュ・コーギーにおいて近年急速に増加している致死性神経変性疾患であり、四肢骨格筋の進行性麻痺から始まり、発症後約 3 年で呼吸筋麻痺により死亡する。現在のところ有効な治療法は存在しない。DM 発症例には、スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 遺伝子の変異が存在すると報告されたが (PNAS. 106:2794-9, 2009)、神経細胞死の詳細な病態機序は不明である。人において SOD1 遺伝子変異は、致死性神経難病である家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすことが知られている。ALS においては変異 SOD1 トランスジェニック (Tg) マウスを用いた研究から神経細胞死に関わる多くの病態機序が解明されたが、いまだ根治療法の確立には至っていない。また、ALS に対する治療薬候補は SOD1 Tg マウスの研究成果を基盤としているが、ALS 患者に対する臨床治験ではその殆どが無効であり、現在までに唯一認可されているリルゾールにおいても、その臨床的効果は極めて限定的である。その理由として、種差に加え導入遺伝子のコピー数の高さに基づく、過剰な蛋白量や本来の病態を誇張したカスケードの存在が想定され、新たなモデルとして自然発症動物が求められている。

これまでに我々は、SOD1 蛋白のミスフォールドと神経細胞内の凝集体形成により、イヌに ALS 様疾患が発生することを報告してきた。この疾患 (DM) は、ALS と同様に上位・下位運動ニューロン変性を病理学的特徴とし、イヌは発症後約 3 年で呼吸筋麻痺により死亡する。我々は DM が ALS Tg マウスが不可避免的に持つ問題点を克服する新たな自然発症 ALS モデル疾患となり得ると考えた。

犬に発生する DM は、自然発生した SOD1 変異遺伝子により生じるため、変異遺伝子のコピー数は ALS と同じであり、ALS と類似する表現型を示す。そのため、DM を新しい ALS モデルとして捉え、変異 SOD1 蛋白による神経細胞死の病態メカニズムを解明すれば DM と ALS の新規治療法の開発につながると考えるが、このような視点での研究は現在までに皆無である。

2. 研究の目的

本研究では変性性脊髄症 (DM) 症例の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、神経細胞およびグリア細胞に分化させることにより、発症例の遺伝的背景を持ち合わせた DM の *in vitro* モデルの構築を行なう事を目的とした。本モデルを用いて、ミグログリアの活性化制御や SOD1 タンパクミスフォールディングの安定化など新規治療薬候補のスクリーニングや DM の病態発生の解明を目指した。

3. 研究の方法

変性性脊髄症 (DM) 発症例の遺伝的背景を持ち合わせた DM の *in vitro* モデルの構築を行なうため、症例の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、神経細胞およびグリア細胞に分化させるためのプロトコルを検討した。DM 症例犬 (変異型 SOD1) および健常犬 (野生型 SOD1) から皮膚片を採取し、線維芽細胞を分離培養した。初期化因子の導入は、ウイルスベクター (レンチウイルス、センダイウイルス) またはエレクトロポレーション法により実施し、遺伝子導入効率および細胞初期化状態の検討を行なった。エピソーマルベクターを用いたエレクトロポレーションによる初期化因子の導入効率と細胞生存率の相関を明らかにし、最適な遺伝子導入条件を検討した。また、変異型 SOD1 遺伝子導入細胞によるモデル構築も行なった。遺伝子導入細胞に対し様々な細胞ストレスを負荷し細胞生存率、ストレスマーカーの発現、SOD1 凝集体の形成率を評価した。DM の病態と小胞体ストレスの関連を証明するために、DM の脊髄における小胞体ストレスマーカー (BiP) の発現解析と BiP 陽性細胞の同定を行った。また、E40K 遺伝子導入培養神経細胞を用いて E40K による小胞体ストレス誘導を解析した。

4. 研究成果

複数の異なる初期化因子導入法を検討したが、安定的に iPS 細胞の樹立が可能な手法の確立には至らなかった。そこで変異型 SOD1 遺伝子導入細胞によるモデル構築を行なった。遺伝子導入細胞に対し様々な細胞ストレスを負荷すると細胞生存率の低下、ストレスマーカーの発現亢進、SOD1 凝集体形成率の増加が認められた。また、DM 症例の脊髄組織において、小胞体ストレスマーカーである GRP78/BiP は、脊髄全域において発現していたが、変性が強く生じる側索領域において顕著であった (図 1)。このことから、本研究で構築した *in vitro* モデルが DM 症例において存在する病態を再現していると考えられた。

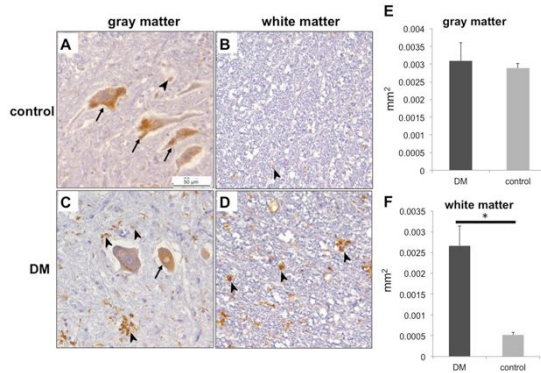


図1. DM 症例の脊髄の免疫組織化学。DM 症例の脊髄白質では GRP78/BiP の発現が上昇している。

IHC により DM 群の脊髄白質において、BiP 陽性グリア細胞の増加を認めた (図 2)。脊髄灰白質の神経細胞では両群で BiP の発現を認めた。DM 群において増加を認めた BiP 陽性グリア細胞はミクログリアおよびアストロサイトであった。Non-DM 群のアストロサイトは BiP 陰性であった。

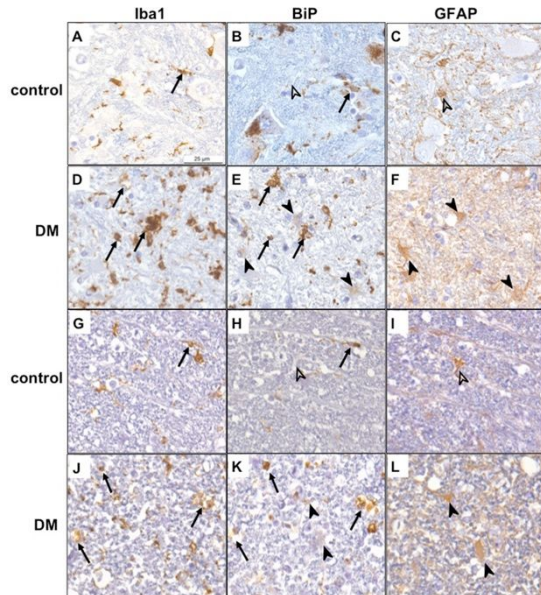


図 2. 頸髄における BiP およびグリアマーカーの免疫組織化学。矢印は BiP 陽性ミクログリアを示す。白矢頭は BiP 陰性アストロサイトをします。黒矢頭は BiP 陽性アストロサイトを示す。

ウェスタンブロットにより、ツニカマイシンを処置した E40K 導入細胞は野生型 SOD1 導入細胞に比べ BiP を高発現していることが明らかとなった (図 3)。以上の結果から、E40K によって小胞体ストレスが誘導され、それに対する応答として BiP 陽性ミクログリアの増加およびアストロサイトの BiP 発現が引き起こされていると考えられた。ミクログリアおよびアストロサイトは小胞体ストレスにより炎症を惹起することが知られており、脊髄白質における小胞体ストレス誘導性炎症が DM の病態に関与していることが示唆された。

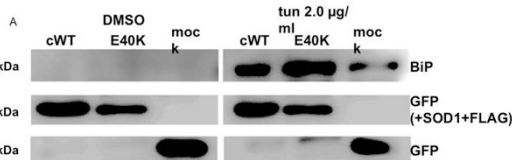
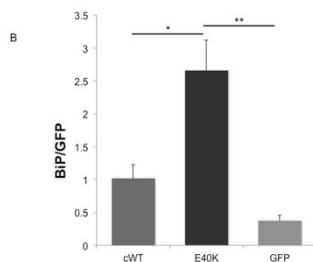


図 3. 野生型 (cWT) および変異型 (E40K) SOD1 遺伝子を導入した Neuro2A 細胞のウェスタンブロット。イヌ SOD1 遺伝子導入細胞において Tunicamycin により誘導された小胞体ストレスは、変異蛋白 (E40K) の発現によりさらに増強した。



脊髄組織の Real time RT-PCR において DM 症例は健常犬と比較し、ER ストレスマーカーである ASK1 および XBP1s の mRNA 転写量は上昇していた (図 4)

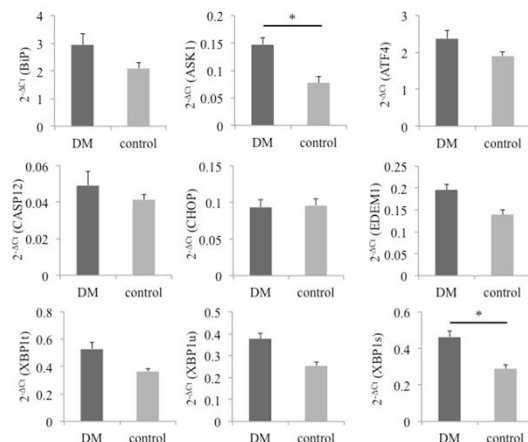


図 4. DM 症例および健常犬の脊髄組織に対する ER ストレスマーカーの Real time RT-PCR。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yokota S, Kobatake Y, Noda Y, Nakata K, Yamato O, Hara H, Sakai H, Nishida H, Maeda S, Kamishina H. Activation of the unfolded protein response in canine degenerative myelopathy. Neuroscience Letters. 査読有、2018;20:216-222.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：保住 功

ローマ字氏名：HOZUMI ISAO

所属研究機関名：岐阜薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20242430

研究分担者氏名：柴田 敏之

ローマ字氏名：SHIBATA TOSHIYUKI

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 50226172

研究分担者氏名：位田 雅俊

ローマ字氏名：INDEN MASATOSHI

所属研究機関名：岐阜薬科大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70512424